

D4

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 août 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale

WO 01/58918 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :** C07H 21/00, A61K 31/708, 7/48, A61P 17/00, C12N 15/11, A61K 7/135, 31/712, 31/7125, 7/48
- (21) Numéro de la demande internationale :** PCT/FR01/00398
- (22) Date de dépôt international :** 9 février 2001 (09.02.2001)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :**
00/01730 11 février 2000 (11.02.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** LVMH RECHERCHE [FR/FR]; 20, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** KURFURST, Robin [FR/FR]; 553, rue de Couasnon, F-45160 Olivet (FR). JOLY, Régine [FR/FR]; 7, rue Antigna, F-45000 Orleans (FR).
- (74) Mandataires :** MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.



(54) Title: NOVEL OLIGONUCLEOTIDES AND USE OF OLIGONUCLEOTIDES MODULATING THE EXPRESSION OF ENZYMES INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF MELANIC PIGMENTS AS DEPIGMENTATION AGENTS

A2
WO 01/58918 A2

(54) Titre : NOUVEAUX OLIGONUCLEOTIDES ET UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES MODULANT L'EXPRESSION D'ENZYMES INTERVENANT DANS LA SYNTHÈSE DE PIGMENTS MELANIQUES, COMME AGENTS DEPIGMENTANTS

(57) Abstract: The invention concerns novel oligonucleotide sequences and their derivatives. Said novel oligonucleotide sequences are capable of being hybridized with the gene or with a product coding for tyrosinase or with the gene or a product of the gene coding for the tyrosinase-related protein 1 (TRP-1). The invention also concerns the use of said novel oligonucleotide sequences as depigmentation or skin whitening agents in a cosmetic composition or a dermatological composition.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouvelles séquences oligonucléotidiques ainsi que leurs dérivés. Ces nouvelles séquences oligonucléotidiques sont capables de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou avec un produit du gène codant pour la tyrosinase ou avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase related-protein 1(TRP-1). La présente invention concerne également l'utilisation de ces nouvelles séquences oligonucléotidiques comme agent dépigmentant ou blanchissant dans une composition cosmétique ou dans une composition dermatologique.

" NOUVEAUX OLIGONUCLEOTIDES ET UTILISATION D'OLIGONUCLEOTIDES
MODULANT L'EXPRESSION D'ENZYMES INTERVENANT DANS LA
SYNTHESE DE PIGMENTS MELANIQUES, COMME AGENTS
DEPIGMENTANTS ".

5 La présente invention concerne des nouvelles séquences oligonucléotides ainsi que leurs dérivés.

Ces nouvelles séquences oligonucléotides sont capables de s'hybrider avec le gène ou avec un produit du gène codant pour l'une des enzymes essentielles intervenant dans la voie de synthèse de pigments mélaniques.

10 La présente invention concerne également l'utilisation de ces nouvelles séquences oligonucléotides comme agents dépigmentants ou blanchissant de la peau dans une composition cosmétique ou dans une composition dermatologique.

15 Chez l'homme, la pigmentation résulte de la synthèse et de la distribution des pigments mélaniques dans la peau, les follicules pileux ou les yeux. La pigmentation est génétiquement prédefinie mais elle est régulée par de nombreux facteurs internes ou externes. Les mélanines produites par les mélanocytes ainsi que le nombre de mélanocytes, leur activité tyrosinasique et leur capacité à exporter les mélanines vers les kératinocytes, la taille des mélosomes qui 20 contiennent des grains de mélanine, vont conditionner la couleur de la peau humaine. Pour chaque individu, la couleur de la peau varie principalement en fonction de l'irradiation plus ou moins importante des rayons ultra-violets (UV). Autrement dit pour chaque individu, il existe une pigmentation cutanée de base lorsqu'il subit la plus faible irradiation UV, correspondant à sa couleur de peau la 25 plus claire, et une pigmentation cutanée plus intense s'il reçoit une irradiation UV plus forte, allant jusqu'à une pigmentation maximum correspondant à sa couleur de peau la plus foncée lorsqu'il est exposé de manière prolongée à une irradiation UV intense, telle que celle que l'on peut rencontrer en altitude en montagne.

D'autre part, comme on le sait bien, il existe dans la population mondiale, 30 une très grande diversité génétique quant à la pigmentation cutanée. Ainsi, selon les populations, la couleur de la peau correspondant à la pigmentation de base définie ci-dessus, présente une teinte plus ou moins claire se situant entre les deux extrêmes : très claire et très foncée. Egalement selon les populations, la

différence de teinte de la peau entre la pigmentation de base et la pigmentation maximum est plus ou moins importante. Ainsi, il est bien connu que les personnes appartenant à certaines populations à peau claire (pigmentation de base) réagissent rapidement et/ou de manière importante à l'action des UV et 5 peuvent donc facilement présenter une peau de teinte foncée, même lorsque ces personnes ne se sont pas exposées volontairement et de façon prolongée au soleil. Dans la suite du texte, ces personnes seront désignées par l'expression « personnes très réactives aux UV ». Il en est notamment ainsi de populations d'origine asiatique ou de certaines populations dites métisses.

10 Par ailleurs, des personnes voient apparaître sur leur peau, en particulier au niveau du visage ou des mains des zones ou des taches plus foncées ou plus colorées conférant à la peau une hétérogénéité. Ces taches sont dues à une concentration importante de mélanine dans les kératinocytes de l'épiderme.

15 Le mécanisme de formation de la pigmentation cutanée fait intervenir la synthèse des mélanines. Ce mécanisme est particulièrement complexe et fait intervenir schématiquement les principales étapes suivantes :



Les enzymes connues intervenant dans cette suite de réactions sont essentiellement la tyrosinase et la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1). Ces 20 enzymes catalysent notamment la réaction de transformation de la tyrosine en Dopa (Dihydroxyphénylalanine) et la réaction de transformation de la Dopa en Dopaquinone conduisant à la formation des pigments mélaniques. Ces enzymes n'interviennent pas individuellement au cours du mécanisme réactionnel de la mélanogenèse. En effet, la tyrosinase et la TRP-1 forment un complexe 25 enzymatique (Winder *et al.* (1994) Cell. Mol. Biol. Res. 40 : 7-8 ; Orlow *et al.* (1994) J. of Investigative Dermatology 103 : 196-211). Ces deux enzymes agissent donc de concert et il semble que ces deux enzymes ne fonctionnent jamais l'une sans l'autre. Il est connu que, lorsqu'une cellule est déplétée en TRP-1, une perte de l'activité tyrosinase est observée (Orlow *et al.* (1994)) ; ceci 30 signifie que la tyrosinase pour être active requiert la présence de TRP-1 (Zhao *et al.* (1996) J. of Investigative Dermatology 106 : 744-752).

Ces enzymes essentielles intervenant dans le voie de synthèse des mélanines seront désignées dans la suite du présent texte par l'expression "enzymes essentielles de la pigmentation".

Une molécule est reconnue comme dépigmentante si elle agit directement sur les mélanocytes épidermiques en inhibant l'activité de ces cellules et/ou si elle bloque l'une des étapes de la biosynthèse des mélanines. C'est le cas notamment lorsque la molécule inhibe l'une des enzymes impliquées dans la mélanogénèse ou lorsqu'elle réagit avec les composés chimiques de la chaîne de synthèse des mélanines.

Les substances dépigmentantes connues sont notamment l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'acide férulique, l'arbutine, des dérivés de dihydroxybenzène (WO 00/47045), des dérivés du guaiacol (WO 00/47179), le 4-(2,3-dihydroxyphényl)-cyclohexanol (WO 00/56279), des dérivés du résorcinol (WO 00/56702), des amides phénoliques (WO 99/32077). Ces substances peuvent présenter certains inconvénients. Elles peuvent être instables, nécessiter une utilisation à des concentrations élevées, manquer de spécificité quant à leur mode d'action, ou présenter un pouvoir cytotoxique ou irritant.

L'utilisation topique de substances dépigmentantes efficaces et inoffensives est particulièrement recherchée en cosmétique et en dermatologie. On utilise notamment ces substances pour traiter des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmes idiopathiques, les hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires dites de senescence (lentigos séniles), les hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou l'hyperpigmentation cicatricielle, ainsi que certaines leucodermies telles que le vitiligo. Dans ces derniers cas, à défaut de pouvoir repigmenter la peau, on atténue la pigmentation de la périphérie des zones dépigmentées pour donner à la peau une couleur plus homogène.

Des substances dépigmentantes sont également utilisées en tant qu'agents de blanchiment de la peau par certaines personnes, en particulier celles désignées plus haut, qui sont très réactives aux UV, pour éclaircir leur teint, notamment celui de leur visage et de leurs mains, afin de conserver une couleur

de peau la plus claire ou la plus homogène possible, ou tout au moins de réduire les effets pigmentants des rayons UV.

Le problème posé aux professionnels est donc la conception, la fabrication ou l'isolement de nouvelles substances dépigmentantes ou de nouveaux agents blanchissant de la peau humaine, des poils ou des cheveux ne présentant pas les inconvenients des substances connues, c'est-à-dire qui soient non irritants, non toxiques et/ou non allergisants pour la peau et stables dans une composition.

L'utilisation d'un oligonucléotide antisens pour traiter les maladies dues à un dysfonctionnement des mélanocytes, en particulier le vitiligo et d'autres maladies dépigmentantes, a été décrite dans WO 99/25819. Dans ces pathologies cutanées, l'hypopigmentation résulte d'une teneur anormalement élevée en ténascine. Les oligonucléotides décrits dans ce document agissent contre l'hypopigmentation en régulant l'expression de la ténascine.

Au contraire, l'objet de la présente invention consiste à fournir un agent dépigmentant agissant sur le processus de la mélanogénèse, destiné d'une part, dans le cas d'une pigmentation sensiblement homogène, au blanchiment de la peau, des poils ou des cheveux, c'est-à-dire à diminuer leur pigmentation, et d'autre part, à lutter contre l'hyperpigmentation cutanée à savoir lorsque la peau présente une hétérogénéité de pigmentation.

Les inventeurs de la présente invention ont trouvé que des oligonucléotides peuvent s'hybrider avec les gènes ou les produits des gènes (tels que les ARN) codant pour les enzymes essentielles de la pigmentation.

Ainsi, les oligonucléotides selon l'invention, en modulant l'expression des enzymes essentielles de la pigmentation dans les mélanocytes, interviennent en amont de la réaction de la mélanogénèse présentée plus haut. Cette activité existe même à très faible concentration, ce qui augmente l'intérêt de ces oligonucléotides. De plus, les oligonucléotides selon l'invention ne présentent aucune cytotoxicité.

Les oligonucléotides selon l'invention offrent une solution idéale aux problèmes posés par les substances utilisées classiquement. Les substances connues qui inhibent l'activité de la tyrosinase ou de la TRP-1 (notamment l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine) présentent de multiples effets secondaires

inacceptables du fait de leur faible spécificité. La présente invention résout donc les problèmes rencontrés par les chercheurs antérieurs en modulant la production des enzymes essentielles de la pigmentation au lieu d'inhiber directement les enzymes pour obtenir l'effet dépigmentant.

5 Les enzymes essentielles fonctionnant de concert sous la forme d'un complexe, les inventeurs ont décrit de nouveaux oligonucléotides qui inhibent l'expression de l'une ou de l'autre des enzymes du complexe afin de résoudre le problème posé.

10 Les oligonucléotides selon l'invention sont nouveaux en tant que tels et nouveaux en tant que médicaments.

La présente invention concerne un oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence entre 9 et 25, entre 12 et 25, entre 15 et 25 ou entre 18 et 25, et de préférence encore comportant un nombre égal à 20, capable de s'hybrider avec le gène ou un produit du gène codant pour 15 l'une des enzymes essentielles de la pigmentation. En particulier, ledit oligonucléotide est capable de s'hybrider avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase, ou bien avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1).

20 La présente invention concerne plus particulièrement un oligonucléotide défini ci-dessus et capable de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase, ou bien avec le gène ou un produit du gène codant pour la TRP-1.

Notamment il s'agit d'un oligonucléotide dont la séquence est choisie 25 parmi les séquences SEQ ID NO.1 à SEQ ID NO.11 ayant la signification suivante :

- SEQ ID NO.1 5'-GCAAAACAAAGACCTGGTTT-3'
- SEQ ID NO.2 5'-AGACCTGGTTGCAGCTCTT-3'
- SEQ ID NO.3 5'-TGCTTGAAATAAGAGTGCAA-3'
- SEQ ID NO.4 5'-AAAATCCAGCTCACAATCCT-3'
- 30 - SEQ ID NO.5 5'-AGGAGCACTCATTCTGCTTG-3'
- SEQ ID NO.6 5'-AGGAACTGGCTAATTGGAGT-3'
- SEQ ID NO.7 5'-CAAGGTCTGCAGGAAGTGGC-3'
- SEQ ID NO.8 5'-CCTCACAAAGGTCTGCAGGAA-3'

- SEQ ID NO.9 5'-CTACAGACAATCTGCCAAGA-3'
- SEQ ID NO.10 5'-GCATTCTTCCTCTAGTCCTC-3'
- SEQ ID NO.11 5'-TTCCAGTACCTCACAAATCCT-3'

La présente invention a également pour objet un oligonucléotide en tant que produit nouveau dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID NO.1 à NO.11 décrites ci-dessus.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par « gène codant pour la tyrosinase », la séquence génomique du gène de la tyrosinase. De même, on entend par « gène codant pour la TRP-1 », la séquence génomique du gène de la TRP-1.

Les rôles clés de la tyrosinase et de la TRP-1 dans la mélanogénèse sont connus. L'utilisation d'oligonucléotides dirigés contre un ARN messager codant pour une enzyme ou une protéine afin d'en moduler l'expression est également connue. Cependant, la technique élaborée par les inventeurs de la présente invention n'avait jamais été utilisée comme moyen de dépigmentation.

Les oligonucléotides selon l'invention sont déterminés pour s'hybrider directement à l'ARN messager ou au gène. Ils permettent ainsi de réaliser une modulation ultime de la quantité de tyrosinase ou de TRP-1 produite par les gènes.

Dans le présent document, le terme "hybridation" est utilisé pour désigner la formation de liaisons hydrogènes, aussi connue comme appariement Watson-Crick entre les bases complémentaires, usuellement sur deux brins d'acide nucléique pour former un duplex en double hélice.

Le degré de complémentarité entre deux séquences d'acide nucléique de longueur identique est déterminé en comparant, après alignement, la première séquence avec la séquence complémentaire de la seconde séquence. Le degré de complémentarité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences ainsi comparées, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le degré de complémentarité entre ces deux séquences.

Le terme "hybridation spécifique" signifie en particulier qu'il existe un degré de complémentarité suffisant pour éviter la fixation non spécifique de

l'oligonucléotide sur une séquence non ciblée dans les conditions où la fixation spécifique est souhaitée. Il est entendu que l'oligonucléotide n'a pas besoin de présenter une complémentarité de 100% avec la séquence de l'acide nucléique cible pour s'hybrider spécifiquement. En particulier, un oligonucléotide présentant 5 un degré de complémentarité au moins égal à 80 % environ est capable de s'hybrider spécifiquement avec l'acide nucléique choisi comme cible.

Les oligonucléotides selon l'invention s'hybrident de préférence spécifiquement avec les gènes ou les produits des gènes codant pour les enzymes essentielles de la pigmentation. En particulier, les oligonucléotides de 10 l'invention sont capables de s'hybrider soit avec l'ADN du gène qui code pour la tyrosinase, soit avec l'ADN du gène qui code pour la TRP-1, soit encore avec l'ARNm dérivant de l'un ou de l'autre de ces gènes. Les oligonucléotides selon l'invention comportent un nombre de nucléotides suffisant en identité et en nombre pour s'hybrider de façon spécifique. Cette propriété est couramment 15 appelée "antisens".

La présente invention a donc pour objet des oligonucléotides qui s'hybrident spécifiquement en amont de ou bien au niveau de la région codante du gène concerné ou bien encore au niveau de la région présentant le codon d'initiation de la traduction de ce gène.

20 La présente invention a aussi pour objet des oligonucléotides qui s'hybrident spécifiquement avec soit l'ADN soit l'ARN messager qui code pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1.

25 La présente invention a aussi pour objet des oligonucléotides qui s'hybrident spécifiquement soit avec la région 5' non codante, soit avec la région présentant le codon d'initiation, soit avec la région codante, soit encore avec la région 3' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1.

30 Dans le cadre de la présente invention, on entend par « ADN qui codent pour la tyrosinase » ou « ADN qui codent pour la TRP-1 », aussi bien les exons que les introns, en particulier les exons.

Il est précisé que :

- ◆ les oligonucléotides de l'invention de séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 4, s'hybrident spécifiquement avec la région 5' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1,
- ◆ l'oligonucléotide de l'invention de séquence SEQ ID NO 5, s'hybride spécifiquement avec la région présentant le codon d'initiation du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1,
- ◆ les oligonucléotides de l'invention de séquences SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 8, s'hybrident spécifiquement avec la région 5' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase,
- ◆ l'oligonucléotide de l'invention de séquence SEQ ID NO 9, s'hybride spécifiquement avec la région codante du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase,
- ◆ l'oligonucléotide de l'invention de séquence SEQ ID NO 10, s'hybride spécifiquement avec la région présentant le codon d'initiation du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase,
- ◆ l'oligonucléotide de l'invention de séquence SEQ ID NO 11, s'hybride spécifiquement avec la région 5' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1.

La présente invention a aussi pour objet des oligonucléotides, comprenant une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de leurs parties sucre, leurs parties nucléobases ou leur squelette internucléotidique qui confèrent des caractéristiques physico-chimiques souhaitables aux oligonucléotides selon l'invention telles qu'une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'affinité pour les séquences cibles, l'augmentation de l'intégration cellulaire ou une meilleure stabilité biologique ou l'augmentation de la stabilité en présence de nuclease cellulaires.

A titre d'exemple, les modifications pouvant conférer ces caractéristiques sont les dérivés 2'-O-alkyle et 2'-O-fluoro sur la partie sucre du nucléoside, et les dérivés phosphorothioates ou les dérivés méthylphosphonates au niveau du squelette internucléotidique.

Dans le présent document, le terme "oligonucléotide" se réfère à des polynucléotides formés à partir de nucléobases naturelles et de groupements

pentafuranosyles (sucre) formant des nucléosides qui sont reliés entre eux par liaisons phosphodiesters natives. Le terme "oligonucléotides" se réfère donc aux espèces naturelles ou aux espèces synthétiques formés à partir de sous unités naturelles ou de leurs homologues proches.

5 Le terme "oligonucléotides" peut se référer aussi aux parties qui ont des fonctions similaires aux oligonucléotides naturels mais qui peuvent présenter des portions non naturelles. Les oligonucléotides peuvent avoir des parties sucre, des parties nucléobases ou des liaisons internucléotidiques modifiées. Parmi les modifications possibles, les modifications préférées sont les dérivés 2'-O-alkyle
10 sur la partie sucre, en particulier les dérivés 2'-O-éthyloxyméthyle ou 2'-O-méthyle, ou les phosphorothioates ou les méthylphosphonates pour le squelette internucléotidique.

Les oligonucléotides chimériques sont compris dans les modifications préférentielles de l'invention. Les oligonucléotides contiennent au moins deux
15 régions chimiquement différentes, chacune comprenant au moins un nucléotide. Il s'agit en particulier d'une ou de plusieurs régions comprenant un nucléotide modifié qui confère une ou plusieurs propriétés bénéfiques comme par exemple une meilleure stabilité biologique, une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou l'augmentation de l'affinité pour l'ARN cible.

20 De façon préférée, le squelette internucléotidique peut être en tout ou partie phosphodiesters ou phosphorothioates ou méthylphosphonates, ou les combinaisons de liaisons phosphodiesters et/ou phosphorothioates et/ou méthylphosphonates.

Ainsi, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce qu'une partie
25 des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates et/ou des groupements méthylphosphonates.

Alternativement, l'oligonucléotide selon l'invention est caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates ou par des groupements méthylphosphonates.
30

Alternativement, les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.

Le terme " oligonucléotides " peut également se référer à des oligonucléotides auxquels on a greffé un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique ou un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique.

- 5 Les oligonucléotides de l'invention sont nouveaux en tant que médicaments.

La présente invention a aussi pour objet une composition cosmétique ou dermatologique contenant au moins un oligonucléotide décrit précédemment et un milieu cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable. Une telle 10 composition peut contenir en outre, un ou plusieurs actifs visant à renforcer les effets recherchés.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une séquence oligonucléotidique dirigée contre un produit de transcription du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la 15 tyrosinase ou la TRP-1, dans ou pour la fabrication d'une composition cosmétique ou dermatologique pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils ou les cheveux humains, ou enlever ou atténuer les taches pigmentaires de la peau humaine.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'un oligonucléotide capable de s'hybrider spécifiquement avec le gène ou un produit 20 du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1, comme agent cosmétique, notamment pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils ou les cheveux humains, et pour atténuer les taches pigmentaires de la peau humaine.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins une 25 séquence oligonucléotidique dirigée contre un produit de transcription du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1, dans ou pour la fabrication d'une composition cosmétique ou dermatologique comme inhibiteur de la synthèse des mélanines.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'au moins un 30 oligonucléotide décrit précédemment pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des maladies se traduisant par la surexpression de la tyrosinase et/ou de la TRP-1, par voie topique. Ce médicament peut être destiné à inhiber la synthèse de mélanine, notamment à dépigmenter ou à

blanchir la peau, mais également pour le traitement ou la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que les taches pigmentaires de 5 senescence (lentigos séniles), des hyperpigmentations accidentelles telles que la photosensibilisation ou la cicatrisation post-lésionnelle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

La présente invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins une séquence oligonucléotide dirigée contre un produit de transcription du gène 10 codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1, dans une composition cosmétique dépigmentante ou blanchissante de la peau humaine.

La présente invention concerne aussi l'utilisation des oligonucléotides décrits précédemment pour moduler l'expression de l'une des enzymes 15 essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1.

La présente invention a encore pour objet l'utilisation d'au moins une séquence oligonucléotidique dirigée contre un produit de transcription du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1, pour la fabrication d'une composition dermatologique 20 dépigmentante ou blanchissante de la peau humaine.

La présente invention se rapporte également à un procédé de traitement cosmétique ou dermatologique pour dépigmenter ou blanchir la peau humaine consistant à appliquer sur la peau pigmentée une composition cosmétique comprenant au moins une séquence oligonucléotidique dirigée contre un produit 25 de transcription du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1.

La présente invention a aussi pour objet une composition dépigmentante caractérisée en ce qu'elle contient, dans un milieu cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable, au moins une séquence oligonucléotidique 30 dirigée contre un produit de transcription du gène codant pour l'une des enzymes essentielles de la pigmentation, en particulier la tyrosinase ou la TRP-1.

Selon un mode de mise en œuvre préféré de la présente invention pour les compositions, les utilisations et le procédé de traitement précités, les

oligonucléotides sont ceux dont la séquence est l'une de celles définies ci-dessous:

- SEQ ID NO.1 5'-GCAAAACAAAGACCTGGTTT-3'
- SEQ ID NO.2 5'-AGACCTGGTTGCAGCTCTT-3'
- 5 - SEQ ID NO.3 5'-TGCTTGAAATAAGAGTGCAA-3'
- SEQ ID NO.4 5'-AAAATCCAGCTCACAAATCCT-3'
- SEQ ID NO.5 5'-AGGAGCACTCATTCTGCTTG-3'
- SEQ ID NO.6 5'-AGGAACCTGGCTAATTGGAGT-3'

La composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention est 10 appropriée pour une utilisation topique et contient donc un milieu cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau. La séquence oligonucléotidique selon l'invention peut être présente en quantité allant de 0,00001% à 10% et de préférence de 0,0003% à 3% du poids total de la composition.

15 La composition de l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques habituellement utilisées pour une application topique notamment sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion de particules polymériques, 20 telles que des nanosphères et des nanocapsules, dans une phase aqueuse ou huileuse, ou encore d'une dispersion de vésicules lipidiques de type ionique ou non-ionique telle que décrite dans le brevet US 4,508,703.

Cette composition peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème blanche ou colorée, d'une pommade, d'un lait, d'un gel, d'une lotion, d'un 25 sérum, d'une pâte ou d'une mousse. Elle peut éventuellement être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide pulvérulent ou non, par exemple sous forme stick ou d'une poudre pressée. Elle peut encore se présenter sous la forme de patchs, de crayons, de pinceaux et d'applicateurs autorisant une application localisée sur les taches du visage ou des 30 mains. Elle peut être utilisée comme produit de soin ou comme produit de maquillage.

De façon connue, la composition de l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans les domaines cosmétique et dermatologique, tels

que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les pigments, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans les domaines 5 considérés. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, dans les vésicules lipidiques ou dans les nanoparticules.

Lorsque la composition cosmétique ou dermatologique de l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller en général de 5 à 80% 10 en poids, et de préférence de 5 à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant généralement de 0,3% à 15 30% en poids, et de préférence de 0,5% à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

Comme huiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles d'origine végétale (huile d'avocat, huile de soja), les huiles d'origine animale 20 (lanoline), les huiles de synthèse (perhydrosqualène), les huiles siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers). On peut aussi utiliser comme matière grasses des alcools gras (alcool cétylique), des acides gras, des cires (cire de Carnauba, ozokérite).

Comme émulsionnants et coémulsionnants utilisables en association avec 25 les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer par exemple les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol tels que le stéarate de PEG-20 et les esters d'acide gras et de glycérine tels que le stéarate de glycéryle.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, on peut citer en particulier les polymères 30 carboxyvinylques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides, les gommes naturelles et les argiles. Comme gélifiants lipophiles, on peut citer les

argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras, la silice hydrophobe et les polyéthylènes.

La présente invention a pour objet une composition cosmétique ou dermatologique contenant au moins un oligonucléotide décrit précédemment et 5 un ou plusieurs autres agents actifs.

La présente invention concerne également l'utilisation d'au moins un oligonucléotide tel que décrit précédemment pour la fabrication d'un médicament destiné à être administré de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps en association avec un ou plusieurs autres actifs.

10 Lesdits actifs utilisables en association avec les oligonucléotides selon l'invention, utilisés purs ou provenant d'extraits renfermant ces molécules, sont notamment les composés suivants: l'acide ellagique et ses dérivés ; l'hydroquinone ; l'arbutine ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothéate sulfonate et ses dérivés ; l'acide kojique ; les extraits 15 placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine, le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide 20 lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acetate, en préparation liposomique ou non ; des agents antiglycations ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine 25 pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc micronisés ; et les 30 acides désoxyribonucléiques ou nucléiques. En cas d'incompatibilité, ces autres actifs et/ou les oligonucléotides de l'invention peuvent être incorporés dans des sphérides, notamment des vésicules formées de lipides amphiphiles ioniques ou

non ioniques telles que décrites dans le brevet US 4,508,703, ou des nanoparticules.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois la limiter.

5 Pour des raisons de stabilité dans les milieux de culture in-vitro et conformément à l'usage, les exemples 2 à 4 ont été réalisés avec des dérivés phosphorothioates et les exemples 5 à 12 ont été réalisés indifféremment avec des dérivés phosphorothioates ou phosphodiesters.

10 Dans les exemples qui suivent, tous les pourcentages sont donnés en poids, sauf indications contraires.

Exemple 1 : Synthèse des Oligonucléotides

A titre d'exemples, des oligonucléotides ont été synthétisés avec un synthétiseur automatique (Perseptive Biosystems Expedite modèle 8909) en utilisant la chimie standard des dérivés phosphoramidites en utilisant les protocoles du constructeur. Les β -cyanoéthyldiisopropylphosphoramidites ont été fournis par la société Perseptive Biosystems. Pour les oligonucléotides phosphodiesters, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée avec une solution d'iode. En ce qui concerne les oligonucléotides phosphorothioates, l'étape d'oxydation du phosphite a été effectuée en utilisant une solution 0,05 M de 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide dans de l'acetonitrile anhydre. Après clivage de la colonne (Controlled Pore Glass, Perseptive Biosystems) et déprotection totale de la séquence par un traitement de 18h à 55°C par une solution d'ammoniaque à 33%, les oligonucléotides ont été purifiées par précipitation dans l'éthanol en présence d'acétate de sodium. Des contrôles par chromatographie liquide haute pression ont été ensuite réalisés par chromatographie échangeuses d'ions avec élution par un gradient de chlorure de sodium et par chromatographie en phase inverse C18 avec élution par un gradient d'acetonitrile en présence d'acétate de triéthylammonium.

Les oligonucléotides synthétisés sont décrits dans le tableau 1. Il s'agit des 11 premières séquences de ce tableau, numérotées de SEQ ID NO.1 à SEQ

ID NO.11. Leur activité dépigmentante a fait l'objet d'études rapportées dans les exemples suivants.

Dans le tableau 1, les numéros mentionnés sous chaque extrémité des séquences indiquent la position de l'oligonucléotide dans les séquences 5 d'origine.

Les séquences proviennent respectivement de la séquence dite « HUMTYRA » de l'ADNc de la tyrosinase humaine, publiée par Shibahara et al., Tohoku J. Exp. Med. 156 : 403 (1988) (Genbank accession number M 27160), de la séquence dite « HSTYRRP » de l'ADNc de la TRP-1 humaine, publiée par 10 Cohen et al., Nucl. Acides Res. 18 : 2807 (1990) (Genbank accession number X 51420), et d'une autre séquence de la TRP-1, dite « AF001295 » publiée par Box et al., Mamm. Genome 9 : 50 (1998) (Genbank accession number AF 001295).

Par ailleurs, à titre comparatif pour confirmer la spécificité des oligonucléotides selon l'invention vis à vis des gènes ou des produits de gènes 15 codant pour la tyrosinase ou la TRP-1, deux oligonucléotides basés sur la séquence SEQ ID N°2 de l'invention, ont été synthétisés, à savoir :

- ❖ Une séquence dite « contrôle sens », désignée SEQ ID N°12 dans le tableau 1, consistant à inverser l'ordre des bases de la séquence SEQ 20 ID N°2.
- ❖ Une séquence dite « contrôle brouillé », désignée SEQ ID N°13, également dans le tableau 1, comprenant les mêmes bases, en nature et en nombre, que celles de la séquence SEQ ID N°2, mais placées dans un ordre quelconque.

TABLEAU 1

SEQ ID NO.	SEQUENCE OLIGONUCLEOTIDE	LOCUS
1. 111	5'-GCAAAACAAAGACCTGGTTT-3' 111	HSTYRRP 92
2. 102	5'-AGACCTGGTTTGAGCTCTT-3' 102	HSTYRRP 83
3. 127	5'-TGCTTGAAATAAGAGTGCAA-3' 127	HSTYRRP 108
4. 53	5'-AAAATCCAGCTCACAAATCCT-3' 53	HSTYRRP 34
5. 141	5'-AGGAGCACTCATTCTGCTTG-3' 141	HSTYRRP 122
6. 475	5'-AGGAACCTGGCTAATTGGAGT-3' 475	HUMTYRA 457
7. 485	5'-CAAGGTCTGCAGGAACCTGGC-3' 485	HUMTYRA 466
8. 490	5'-CCTCACAAAGGTCTGCAGGAA-3' 490	HUMTYRA 471
9. 1332	5'-CTACAGACAATCTGCCAAGA-3' 1332	HUMTYRA 1313
10 506	5'-GCATTCTCCTCTAGTCCTC-3' 506	HUMTYRA 487
11. 5875	5'-TTCCAGTACCTCACAAATCCT-3' 5875	AF001295 5856
12.	5'-TTCTCGACGTTGGTCCAGA-3'	CONTROLE SENS SEQ ID NO.2
13.	5'-ACGTTCTCGCCTAGTGATG-3'	CONTROLE BROUILLE SEQ ID NO.2

Exemple 2 : Effet dépigmentant des oligonucléotides selon l'invention sur des mélanocytes humains normaux (MHN)

Les oligonucléotides selon l'invention figurant dans le tableau 1 de l'exemple 5 1 (SEQ ID N° 1 à SEQ ID N° 11) sont étudiés pour leur action sur la mélanogénèse, et donc sur leur capacité à moduler la production de pigments mélaniques par les mélanocytes. A titre d'éléments de comparaison, les oligonucléotides « contrôle sens » (SEQ ID N° 12) et « contrôle brouillé » (SEQ ID N° 13) sont également étudiés pour cette action.

10 Il est rappelé qu'au cours du mécanisme réactionnel de la mélanogénèse, la tyrosinase et la TRP-1 forment un complexe enzymatique qui catalyse la transformation de la L-dopa en dopaquinone puis en dopachrome. Ces deux enzymes agissent de concert et il semble qu'elles ne fonctionnent jamais l'une sans l'autre. En effet, lorsqu'une cellule est déplétée en TRP-1 par l'utilisation 15 d'oligonucléotides antisens dirigés contre TRP-1, une diminution de l'activité tyrosinase encore appelée « dopa-oxydase » est observée. La tyrosinase est également dénommée « dopa-oxydase » en raison de sa nature multi-fonctionnelle ; elle remplit en effet la même fonction que la dopa-oxydase au cours de l'oxydation de la tyrosine en dopa.

20 Le principe du présent test est basé sur la mesure de la vitesse de réaction de la dopa-oxydase dans la transformation de la L-dopa, utilisée comme substrat, en dopachrome. L'apparition de dopachrome est quantifiée par mesure de densité optique à intervalles de temps déterminés, ce qui permet de calculer la vitesse de réaction de la dopa-oxydase pour chacun des oligonucléotides testés 25 et pour l'essai témoin. A partir des résultats obtenus, il sera donc possible d'apprécier l'action des oligonucléotides testés sur la mélanogénèse. Une baisse de la vitesse de réaction par rapport à l'essai témoin correspondra à une diminution de l'activité enzymatique, et par conséquent, à la réduction de la formation de pigments mélaniques, et donc à un effet dépigmentant.

30

Préparation de cultures de mélanocytes et traitements par les oligonucléotides :

Les mélanocytes sont obtenus à partir de peau de prépuce d'un enfant de type caucasien. Les fragments de peau sont rincés au PBS (Gibco, Paisley, GB),

puis à l'éthanol à 70%. Après un dernier lavage au PBS, la peau est découpée en fines bandelettes de 1 mm comportant un minimum de derme. Le derme et l'épiderme sont dissociés par incubation des bandelettes dans une solution de trypsine à 0,25% (Gibco, Paisley, GB) pendant une nuit à 4°C. Après incubation,

5 les cellules épidermiques sont récupérées en grattant les cellules au scalpel. L'action de la trypsine est stoppée en plaçant les cellules dans un milieu E-199 (Gibco, Paisley, GB) contenant 10% (V/V) de sérum de veau foetal (Gibco, Paisley, GB). Après homogénéisation et élimination des cornéocytes flottant en surface, la suspension cellulaire est filtrée, centrifugée et le culot est repris dans

10 un milieu d'adhérence (Milieu 1) dont la composition est présentée dans le tableau suivant, dans lequel EGF désigne un facteur de croissance épidermique.

COMPOSITION DU MILIEU 1		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu E-199	Gibco, 31150-022	qsp 100% (v/v)
- Sérum de veau fœtal	Gibco, 10099-133	10 % (v/v)
- Hydrocortisone	Sigma, H-0135	0,4 µg/ml
- L-glutamine	Gibco, 25030-024	2 mM
- EGF	Sigma, E-4127	10 ng/ml

Après dénombrement de la population cellulaire, les cellules sont ensemencées en flasques à raison de 200000/cm². Les cultures sont maintenues à 37°C, en atmosphère saturée en humidité et avec 5% CO₂. Après adhésion des

15 cellules, le milieu d'adhérence est remplacé par du milieu KSFM (Gibco , Paisley, GB), qui sera renouvelé toutes les 48h.

Les cellules épidermiques ainsi mises en culture vont permettre l'obtention d'une coculture kératinocytes-mélanocytes. Dès que cette coculture est à environ 70% de confluence, le milieu KSFM est remplacé par un milieu sélectif (Milieu 2) favorisant la croissance des mélanocytes, et dont la composition figure au tableau ci-après, dans lequel IBMX désigne la 3-isobutyl-1-méthyl-xanthine, et PMA désigne le phorbol-12-myristate-13-acétate.

COMPOSITION DU MILIEU 2		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu E-199	Gibco, 31150-022	qsp 100% (v/v)
- Sérum de veau fœtal	Gibco, 10099-133	10 % (v/v)
- L-glutamine	Gibco, 25030-024	0,4 µg/ml
- IBMX	Sigma, I-5879	2 mM
- PMA	Sigma, P-8139	10 ng/ml
- Généticine	Gibco, 066-01811Y	100µg/ml

48 à 72 h après, les cellules sont décollées de la flasque à l'aide d'un mélange trypsine 0,1%-EDTA 0,05% (Gibco, Paisley, GB) pendant 1 à 2 minutes à température ambiante. La suspension cellulaire obtenue est centrifugée et 5 remise en milieu sélectif. Les cellules sont à nouveau traitées 24 à 48h plus tard avec le mélange trypsine-EDTA (0,1%-0,05%), pendant 1 à 2 minutes à température ambiante, puis réensemencées dans un milieu de prolifération spécifique des mélanocytes (Milieu 3).

Le Milieu 3 est composé de 10 % de Milieu 2 et de 90 % de Milieu A. Le 10 Milieu A est le milieu kératinocyte SFM (Gibco, 17005-034).

A ce stade, la population cellulaire obtenue est pure, constituée exclusivement de mélanocytes humains normaux (MHN).

Avant l'étude, les MHN sont placés pendant une semaine dans un milieu ne contenant aucun activateur métabolique puissant tels les esters de phorbol ou 15 l'IBMX (Milieu 4).

Le Milieu 4 est composé de 10 % de Milieu B et 90 % de Milieu A décrit précédemment. La composition du milieu B est décrite dans le tableau ci-dessous.

COMPOSITION DU MILIEU B		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu E-199	Gibco, 31150-022	qsp 100% (v/v)
- Sérum de veau fœtal	Gibco, 10099-133	10 % (v/v)
- L-glutamine	Gibco, 25030-024	2 mM

Les MHN sont ensemencés en microplaques 96 puits (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA), à raison de 10000 cellules par puits, dans 200 µl de milieu 4.

Les oligonucléotides à tester sont préparés extemporanément dans le 5 milieu d'étude, respectivement à des concentrations de 10 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1µM. Les traitements avec les différents oligonucléotides sont réalisés chaque jour pendant 7 jours. Pour chaque concentration, 3 essais sont réalisés.

Mesure de vitesses de réaction de l'activité dopa-oxydase :

10 A la fin de ces traitements répartis sur 7 jours, des mesures de l'activité tyrosinase ou « dopa-oxydase » sont réalisées.

Les cellules sont rincées au PBS, puis 50 µl de tampon de lyse (Triton 100X Sigma, T-9284) à 0,5 % dans du PBS (Gibco, 14190-094) sont ajoutés dans les puits et la plaque est mise sous agitation pendant une heure à 4°C. La 15 réaction est initiée en ajoutant 50 µl de substrat (L-DOPA 10 mM, Sigma) dans chaque puits. L'apparition du dopachrome est mesurée toutes les 2 minutes à 450 nm pendant une heure et à 37°C, sous agitation régulière, au moyen d'un lecteur de densité optique, lecteur de microplaques 340 ATTC (SLT-LabInstrument, Grödig/Salzburg, Autriche). Les vitesses de réaction sont 20 calculées et exprimées en 10^{-4} Unité DO/mn.

Les résultats obtenus pour les cultures traitées par les oligonucléotides et pour les cultures témoin (non traitées) figurent dans le tableau 2 (σ : écart-type).

TABLEAU 2

Numéros d'identification et concentrations des oligonucléotides testés		Vitesses de réaction 10^{-4} unité DO/mn	Vitesses de réaction (témoin sans oligonucléotide)	% de variation par rapport au témoin
SEQ ID NO.1	10 nM	21,8 $\sigma = 1,0$	26,4 $\sigma = 1,8$	-17,4
	100 nM	23,3 $\sigma = 0,4$	26,4 $\sigma = 1,8$	-11,7
	250 nM	20,3 $\sigma = 0,3$	26,4 $\sigma = 1,8$	-23,1
	500 nM	19,5 $\sigma = 2,9$	26,4 $\sigma = 1,8$	-26,1
	1 μ M	23,9 $\sigma = 1,4$	26,4 $\sigma = 1,8$	-9,4
SEQ ID NO.2	10 nM	20,5 $\sigma = 1,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-22,3
	100 nM	18,8 $\sigma = 1,5$	26,4 $\sigma = 1,8$	-28,8
	250 nM	19,2 $\sigma = 0,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-27,3
	500 nM	19,7 $\sigma = 1,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-25,4
	1 μ M	22,9 $\sigma = 1,1$	26,4 $\sigma = 1,8$	-13,3
SEQ ID NO.3	10 nM	23,7 $\sigma = 3,1$	26,4 $\sigma = 1,8$	-10,2
	100 nM	20 $\sigma = 0,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-24,2
	250 nM	21,1 $\sigma = 0,6$	26,4 $\sigma = 1,8$	-20,1
	500 nM	19,9 $\sigma = 1,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-24,6
	1 μ M	23,6 $\sigma = 0,6$	26,4 $\sigma = 1,8$	-10,6
SEQ ID NO.4	10 nM	22,9 $\sigma = 1,2$	26,4 $\sigma = 1,8$	-13,3
	100 nM	19,9 $\sigma = 1,6$	26,4 $\sigma = 1,8$	-24,6
	250 nM	20,9 $\sigma = 1,4$	26,4 $\sigma = 1,8$	-20,8
	500 nM	21,2 $\sigma = 1,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-19,7
	1 μ M	20 $\sigma = 1,2$	26,4 $\sigma = 1,8$	-24,2
SEQ ID NO.5	10 nM	23,5 $\sigma = 0,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-10,9
	100 nM	19,3 $\sigma = 0,9$	26,4 $\sigma = 1,8$	-26,9
	250 nM	17,9 $\sigma = 1,7$	26,4 $\sigma = 1,8$	-32,2
	500 nM	20,5 $\sigma = 0,6$	26,4 $\sigma = 1,8$	-22,4
	1 μ M	21,3 $\sigma = 0,8$	26,4 $\sigma = 1,8$	-19,3

Numéros d'identification et concentrations des oligonucléotides testés	Vitesses de réaction 10^{-4} unité DO/mn	Vitesses de réaction (témoin sans oligonucléotide)	% de variation par rapport au témoin
SEQ ID NO.6	10 nM	20,7 $\sigma = 1,8$	-21,6
	100 nM	22,0 $\sigma = 0,6$	-16,7
	250 nM	20,1 $\sigma = 2,5$	-23,9
	500 nM	18,7 $\sigma = 2,6$	-29,2
	1 μ M	20,5 $\sigma = 1,1$	-22,4
SEQ ID NO.7	10 nM	26,6 $\sigma = 2,2$	+6,4
	100 nM	25,3 $\sigma = 1,1$	+1,2
	250 nM	23,8 $\sigma = 1,3$	-4,8
	500 nM	21,7 $\sigma = 0,9$	-13,2
	1 μ M	22,6 $\sigma = 0,7$	-9,6
SEQ ID NO.8	10 nM	24,1 $\sigma = 0,1$	-3,6
	100 nM	23,7 $\sigma = 0,6$	-2,5
	250 nM	25,1 $\sigma = 1,0$	+0,4
	500 nM	23,4 $\sigma = 0,6$	-6,4
	1 μ M	23,7 $\sigma = 0,2$	-5,2
SEQ ID NO.9	10 nM	27,1 $\sigma = 0,7$	+8,4
	100 nM	22,3 $\sigma = 0,6$	-10,8
	250 nM	22,6 $\sigma = 0,2$	-9,6
	500 nM	23,2 $\sigma = 0,5$	-7,2
	1 μ M	25,0 $\sigma = 0,7$	0

Numéros d'identification et concentrations des oligonucléotides testés	Vitesses de réaction 10^{-4} unité DO/mn	Vitesses de réaction (témoin sans oligonucléotide)	% de variation par rapport au témoin
SEQ ID NO.10	10 nM 26,4 $\sigma = 0,9$	25,0 $\sigma = 0,9$	+5,6
	100 nM 24,9 $\sigma = 0,5$	25,0 $\sigma = 0,9$	-0,4
	250 nM 23,1 $\sigma = 0,3$	25,0 $\sigma = 0,9$	-7,6
	500 nM 23,3 $\sigma = 0,6$	25,0 $\sigma = 0,9$	-6,8
	1 μ M 26,9 $\sigma = 0,7$	25,0 $\sigma = 0,9$	+7,6
SEQ ID NO.11	10 nM 25,7 $\sigma = 0,9$	25,0 $\sigma = 0,9$	+2,8
	100 nM 24,8 $\sigma = 0,3$	25,0 $\sigma = 0,9$	-0,8
	250 nM 25,8 $\sigma = 0,7$	25,0 $\sigma = 0,9$	+3,2
	500 nM 22,1 $\sigma = 4,4$	25,0 $\sigma = 0,9$	-11,6
	1 μ M 23,9 $\sigma = 0,8$	25,0 $\sigma = 0,9$	-4,4
SEQ ID NO.12	50 nM 34,6 $\sigma = 1,0$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 6,5
	100 nM 33,2 $\sigma = 0,7$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 2,2
	150 nM 33,9 $\sigma = 0,7$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 4,3
SEQ ID NO.13	50 nM 33,5 $\sigma = 1,2$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 3,1
	100 nM 36,3 $\sigma = 0,6$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 11,7
	150 nM 34,0 $\sigma = 1,2$	32,5 $\sigma = 1,4$	+ 4,6

Des résultats figurant au tableau 2, il ressort clairement que le traitement des cultures de mélanocytes par les oligonucléotides de l'invention (SEQ ID NO.1 à SEQ ID NO.11) conduit à une diminution de la vitesse de réaction de l'activité 5 dopa-oxydase. Cette diminution est particulièrement nette pour les oligonucleotides SEQ ID NO.1 à SEQ ID NO.6.

En revanche pour les oligonucléotides testés à titre de comparaison par rapport à l'oligonucléotide SEQ ID NO.2, à savoir le « contrôle sens » SEQ ID NO.12 et le « contrôle brouillé » SEQ ID NO.13, on constate une augmentation de

la vitesse de réaction de l'activité dopa-oxydase à chacune des concentrations testées. Par exemple à la concentration de 100 nM, la vitesse de réaction augmente de 2,2 % et de 11,7 % respectivement pour le « contrôle sens » et le « contrôle brouillé », tandis qu'elle diminue de 28,8 % dans le cas de 5 l'oligonucléotide anti-sens SEQ ID NO.2 selon l'invention.

On peut déduire de cette dernière observation que l'activité des oligonucléotides de l'invention, qui diminuent la vitesse de réaction de l'activité dopa-oxydase, est due nécessairement à l'hybridation spécifique de l'oligonucléotide avec l'ARN messager cible codant pour la tyrosinase ou celui 10 codant pour la TRP-1.

De ce fait, cette interaction oligonucléotide – ARNm va empêcher la traduction de l'information portée par l'ARN messager ciblé et donc entraîner une diminution de l'expression intracellulaire de la tyrosinase, ou de la TRP-1 selon la séquence antisens utilisée. Autrement dit, cette interaction va diminuer la 15 néosynthèse de la tyrosinase ou de la TRP-1. En raison du renouvellement naturel de ces enzymes, ceci entraîne une diminution de la quantité de tyrosinase et de TRP-1 dans les cellules, et par conséquent une diminution de l'activité de ces enzymes en rapport avec la synthèse de mélanine. De fait, les oligonucléotides de l'invention agissent en réduisant le renouvellement de la 20 tyrosinase et de la TRP-1, au lieu d'intervenir sur la tyrosinase déjà présente dans les mélanocytes.

La conséquence de cette action au niveau des mélanocytes est la réduction de la capacité de synthèse de mélanines par ces cellules, d'où, selon les cas et les individus concernés, la production d'un effet blanchissant ou 25 dépigmentant.

Exemple 3 : Effet dépigmentant d'un oligonucléotide selon l'invention sur des mélanocytes humains normaux d'un donneur adulte mulâtre

Les mélanocytes utilisés ici sont obtenus à partir de peau de cuisses d'un 30 donneur adulte mulâtre. Les fragments de peau sont rincés au PBS (Gibco, Paisley, GB) puis lavés avec de l'éthanol 70% (V/V) dilué à 50% dans du PBS. Après lavage au PBS, les fragments de peau sont grattés à l'aide d'un coupe-

cors. Les morceaux obtenus sont grattés dans de la trypsine 0,05% (Difco Laboratories, West Molesy, GB) pendant une heure à 37°C afin de permettre leur dissociation. L'épiderme est alors recueilli dans du milieu E-199 (Gibco, Paisley, GB) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco, Paisley, GB). Après 5 homogénéisation et élimination des fragments de couche cornée flottant en surface, la suspension cellulaire est filtrée puis centrifugée. Le culot cellulaire obtenu est repris dans du Milieu 1 décrit à l'exemple 2. Les cellules sont dénombrées et une mesure de la viabilité cellulaire est réalisée sur cellule de Thoma par le test d'exclusion du bleu trypan. Les cellules épidermiques sont 10 finalement ensemençées dans du Milieu 1, en flasques à raison de 80000 cellules/cm². Les cultures sont maintenues à 37°C, en atmosphère saturé en humidité et avec 5% de CO₂.

Le Milieu 1 est remplacé par un Milieu 6 dont la composition est précisée au tableau ci-dessous, dans lequel B-FGF désigne un facteur de croissance de 15 fibroblastes de base, et PdBu désigne le phorbol-12,13-dibutyrate.

COMPOSITION DU MILIEU 6		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu E-199	Gibco, 31150-022	qsp 100% (v/v)
- Insuline	Sigma, H-0888	0,5 µg / ml
- EGF	Sigma, E-4127	10 ng / ml
- B-FGF	Gibco, 13256-029	10 ng / ml
- PdBu	Sigma, P-1269	0,25 µg / ml
- Chlorure de calcium	Prolabo, 22317297	1,8 mM

Ce milieu est renouvelé toutes les 48 heures pendant une à deux semaines.

Après cette sélection des mélanocytes, on favorise la prolifération des 20 MHN, en remplaçant le Milieu 6 par le Milieu 7.

Le Milieu 7 est composé de 10 % de Milieu C et 90 % de Milieu A décrit précédemment, complémenté par PdBu (Sigma, P-1269) dont la concentration finale dans le milieu est de 0,25 µg / ml.

COMPOSITION DU MILIEU C		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu E-199	Gibco, 31150-022	qsp 100% (v/v)
- Sérum de veau fœtal	Gibco, 10099-133	10 % (v/v)
- L-glutamine	Gibco, 25030-024	2 mM
- IBMX	Sigma, I-5879	10 ⁻⁴ M
- Génécitine	Gibco, 066-01811Y	100 µg / ml

5 A ce stade, la population cellulaire obtenue est pure. Elle est constituée exclusivement de MHN.

Les MHN sont ensemencés en microplaques 96 puits (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) dans du Milieu 6. Après 24h, le milieu est remplacé par du Milieu 8 qui servira pendant toute la fin de cette étude. La composition du Milieu 8 est 10 décrite ci-dessous.

COMPOSITION DU MILIEU 8		
Composés	Fournisseur, référence	Concentration finale dans le milieu
- Milieu MCDB-153	Sigma, M-7403	qsp 100% (v/v)
- Sérum de veau fœtal	Gibco, 10099-133	2 % (v/v)
- Insuline	Sigma, I-6634	5 µg / ml
- Transferrine	Sigma	10 µg / ml
- α-Tocophérol	Sigma, T1157	1 µg / ml
- Pénicilline/ Streptomycine	Sigma, P4333	0,4 % (v/v)

L'oligonucléotide SEQ ID NO.2 est ajouté extemporanément dans le milieu d'étude, à des concentrations de 50 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM, 1µM. Les traitements sont effectués chaque jour pendant 7 jours. Pour chaque concentration, 6 essais sont réalisés.

5

Mesure de vitesses de réaction de l'activité dopa-oxydase :

A la fin de ces traitements répartis sur 7 jours, des mesures de l'activité dopa-oxydase sont réalisées. Ces mesures sont pratiquées de la même manière qu'à l'exemple 2. Les vitesses de réaction sont calculées et exprimées en 10^{-4}

10 Unité DO/mn.

Les résultats obtenus pour les cultures traitées par l'oligonucléotide SEQ ID NO.2 et pour les cultures témoin non traitées figurent dans le tableau 3 (σ : écart type).

TABLEAU 3

15

Concentrations de l'oligonucléotide SEQ ID NO. 2	Vitesses de réaction	Vitesses de réaction (témoin sans oligonucléotide)	% de variation par rapport au témoin
50 nM	33,8 $\sigma = 3,4$	33,0 $\sigma = 3,5$	+2,4
100 nM	29,8 $\sigma = 1,3$	33,0 $\sigma = 3,5$	-9,7
250 nM	29,6 $\sigma = 2,2$	33,0 $\sigma = 3,5$	-10,3
500 nM	28,3 $\sigma = 1,5$	33,0 $\sigma = 3,5$	-14,2
1 µM	27,6 $\sigma = 2,9$	33,0 $\sigma = 3,5$	-16,3

On observe d'après les résultats ci-dessus, qu'à partir d'une concentration assez faible en oligonucléotide (100 nM) et au dessus de cette concentration, la vitesse de réaction de l'activité dopa-oxydase diminue très sensiblement.

20 Ainsi, comme cela a déjà été expliqué en conclusion de l'exemple 2, les oligonucléotides selon l'invention réduisent la capacité de synthèse de mélanine par les mélanocytes. Il est démontré dans le présent test que cette réduction est indépendante des caractéristiques génétiques de la personne concernée.

Dans le présent exemple, s'agissant d'un donneur mulâtre présentant une pigmentation de base correspondant à une couleur de peau foncée, l'utilisation d'un oligonucléotide selon l'invention, conduira à un effet blanchissant, c'est-à-dire à un éclaircissement de la teinte de la peau.

5

Exemple 4 : Etude de l'inhibition de la mélanogénèse UV-induite, sur des mélanocytes humains normaux par un oligonucléotide selon l'invention

10 A la suite des résultats des exemples précédents, l'objectif du présent test est de vérifier si les oligonucléotides de l'invention sont également actifs dans le cas où les mélanocytes sont activés par une stimulation, en l'occurrence par une irradiation ultra-violette UVB (280-320 nm). Autrement dit, il s'agit d'évaluer la capacité des oligonucléotides à réduire l'activité de la dopa-oxydase de
15 mélanocytes indépendamment de la stimulation de la mélanogénèse.

A cet effet, le test porte sur des mélanocytes d'un donneur adulte de type caucasien. Les mélanocytes utilisés ici sont obtenus à partir de peau de plastie mammaire. La technique d'obtention de ces mélanocytes est la même que celle utilisée et décrite dans l'exemple 3.

20 L'expérience est réalisée en boîtes 35 mm. Les mélanocytes sont ensemencés en boîtes 35 mm (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) à raison de 250000 cellules et 2 ml de Milieu 8 par boîte. La composition du Milieu 8 est décrite à l'exemple 3. Les traitements avec l'oligonucléotide SEQ ID NO.2 ainsi que les irradiations UVB (Bio-Energie, Vilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée, France)
25 à 8 mJ/cm² commencent 24h après l'ensemencement.

Avant chaque irradiation UVB, les MHN sont placés dans du PBS (2ml/boîte). Après irradiation, les cellules sont replacées dans 2 ml de Milieu 8 contenant ou non l'oligonucléotide SEQ ID NO.2.

30 L'oligonucléotide SEQ ID NO.2 est ajouté extemporanément dans le milieu d'étude (Milieu 7 de l'exemple 3), à des concentrations de 100 nM, 250 nM et 500 nM.

Ces traitements avec l'oligonucléotide sont effectués chaque jour pendant 9 jours. Les irradiations ont lieu chaque jour, sauf les jours 5 et 6. Pour chaque concentration, 3 essais sont réalisés.

5 Mesure de vitesses de réaction de l'activité dopa-oxydase :

A la fin de ces traitements, à savoir 9 jours de traitement avec l'oligonucléotide et 7 irradiations, des mesures de l'activité dopa-oxydase sont réalisées.

- A cet effet, les MHN sont décollées des boîtes 35 mm à l'aide de 500 µl de trypsine 0,1% - EDTA 0,05%, puis reprises dans 1,5 ml de milieu E-199 sans rouge de phénol (Gibco) et supplémentés par 10 % de sérum de veau foetal. Une portion aliquote de cette suspension cellulaire est utilisée pour un dénombrement cellulaire une autre est centrifugée et le culot de mélanocytes obtenu est repris dans 50 µl de tampon de lyse pour la mesure de la vitesse de réaction de la dopa-oxydase comme décrit exemple 2.

Les vitesses de réaction de l'activité dopa-oxydase sont calculées et exprimées en 10^4 Unité DO / mn / 10^6 MHN. Les résultats obtenus sont présentés dans la tableau 4 (σ : écart-type).

20

TABLEAU 4

Traitements des cultures de cellules : irradiation UVB / concentration en oligonucléotides SEQ ID NO.2	Vitesse de réaction	% de variation par rapport au témoin non irradié	% de variation par rapport au témoin irradié
Non irradiation / aucun oligonucléotide (témoin-non irradié)	368,2 $\sigma = 19,9$	0	
Irradiation / aucun oligonucléotide (témoin irradié)	409,1 $\sigma = 32,6$	+ 11,1 %	0
Irradiation / 100 nM	328,1 $\sigma = 44,8$		- 19,8 %

Irradiation / 250 nM	325,3 $\sigma = 43,1$		- 20,5 %
Irradiation / 500 nM	327,4 $\sigma = 49,5$		- 20 %

Les résultats ci-dessus démontrent clairement que les oligonucléotides selon l'invention, diminuent très sensiblement la vitesse de réaction de l'activité dopa-oxydase dans le cas de mélanocytes stimulés sous l'effet d'un rayonnement UVB.

- 5 Ainsi les oligonucléotides de l'invention diminuent non seulement la capacité des mélanocytes à l'état d'activité basale à synthétiser de la mélanine, comme cela a été montré dans les exemples précédents, mais ils diminuent aussi cette capacité pour les mélanocytes à l'état activé. Ces oligonucléotides pourront donc être également utilisés en particulier pour prévenir ou atténuer une
10 pigmentation déclenchée par le rayonnement ultra-violet présent dans la lumière solaire.

15 **Exemple 5 : Poudre pour l'éclaircissement du teint du visage**

Microcellulose	20,00%
Sodium lauryl sulfoacetate	15,00%
Oligonucléotide (SEQ ID NO.5) (phosphodiester)	1,00%
Parfum, colorants, conservateurs	qs.
Talc	Qsp. 100%

- Cette poudre présente une double action. Elle permet un nettoyage de la peau, et de plus elle permet, par un usage régulier durant quelques jours,
20 d'éclaircir le teint. On peut l'appliquer sur la peau du visage une à deux fois par jour.

Exemple 6 : Emulsion-gel visage de jour dépigmentante

Glycérine	5,00%
triglycérides	5,00%
caprylique/caprique/succinique	
Méthoxycinnamate d'octyle	1,00%
Diméthicone copolyol	0,50%
Acrylates / C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50%
Oligonucléotide SEQ ID NO.3 (phosphodiester)	0,01%
Neutralisant	qs.
Conservateurs, parfum, colorants	qs.
Eau	qsp. 100%

Certaines personnes soumises au rayonnement plus ou moins intense de la lumière du jour, voire du soleil directement, souhaitent conserver un teint clair et éviter l'apparition de taches pigmentées. L'utilisation de l'émulsion-gel ci-dessus permettra d'atteindre ce but. Cette composition s'applique sur le visage généralement le matin. Elle agit aussi bien de manière préventive que curative sur la pigmentation, régulière ou non, du visage.

10

Exemple 7 : Fluide protecteur SPF 30 préventif des taches pigmentaires

Pentacyclométhicone volatile	49,00%
Dioxyde de titane	15,00%
Méthoxycinnamate d'octyle	7,50%
Glycérine	5,00%
Phényltriméthicone	5,00%
Diméthicone copolyol	3,00%
Polyméthylméthacrylate	2,50%

Butyl méthoxydibenzoyle méthane	1,00%
Oligonucléotide SEQ ID NO.2 (phosphodiester)	0, 1%
Neutralisant, parfum, conservateurs, antioxydants	qs.
Eau	qsp. 100%

Cette composition est à utiliser pour prévenir l'apparition de taches pigmentaires, chez les personnes prédisposées à ce phénomène, avant l'exposition à un rayonnement solaire intense. Il est à noter que la présence d'une concentration élevée en filtre solaire permet de compenser la diminution de la protection naturelle, conséquence de la baisse du taux de mélanine.

5

Exemple 8 : Crème visage dépigmentante

Glycéryl stéarate + Peg-100 stéarate	5,00%
Polyisobutène hydrogéné	4,00%
Magnésium ascorbyl phosphate	3,30%
Tricaprylate /caprate de glycérol	3,00%
Squalane	3,00%
Glycérine	2,00%
Cire d'abeille	1,50%
Cétéaryl octanoate	1,50%
Alcool cétylique	1,00%
Alcool stéarylique	1,00%
Diméthicone	1,00%
Gomme xanthane	0,30%
Acide éthylène diamine tétracétique	0,20%
Acide citrique	0,10%
Citrate de sodium	0,10%
Oligonucléotide SEQ ID NO.6 (phosphodiester)	0,10%

Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp. 100%

L'utilisation de cette crème permet de traiter les irrégularités de la pigmentation cutanée, en atténuant ou supprimant les taches de senescence ou les taches pigmentaires actiniques. Elle homogénéise la coloration de la peau et éclaire le teint.

5

Exemple 9 : Lotion visage pour éclaircir le teint

Alcool éthylique	30,00%
PPG-3 Myristyl éther	5,00%
Glycérine	2,00%
Carbomer	0,20%
Polysorbate 20	0,20%
Oligonucléotide SEQ ID NO.4 (phosphorothioate)	0,01%
Neutralisant, Parfum, Conservateurs	qs.
Eau	qsp. 100%

Cette lotion pour éclaircir le teint s'utilise après le démaquillage et le
10 nettoyage de la peau.

Exemple 10 : Sérum Visage éclaircissant

Eau	qsp 100%
Glycerine	2%
EDTA tetrasodique	qsp pH 6
Acide citrique	
Citrate trisodique	
Gomme xanthane	0.25%

Polyacrylamide, C13.14 soparaffin,	0.5%
laureth-7	
Dimethicone copolyol	0.25%
Oligonucléotide SEQ ID n° 2 (phosphodiester)	0.1%
Parfum, colorant, conservateur	qs

Une goutte de cette composition très concentrée de sérum, s'applique sur le visage généralement avant l'application d'une crème pour le visage. Ce sérum s'utilise habituellement par cures d'une à deux semaines pour obtenir ou

- 5 entretenir un éclaircissement du teint.

Exemple 11 : Lotion capillaire pour éclaircir la chevelure

Eau	qsp 100%
Alcool	50%
Panthenylethyl ether	0.5%
Acétate DL- α -tocopherol	0.2%
Polysorbate 60	1%
Oligonucléotide SEQ ID NO.1 (phosphorothioate)	0.01%
Parfum	0.2%
Glycerine	0.5%
Colorant	qs

- 10 Cette lotion s'applique sur les cheveux matin et soir pendant la durée nécessaire pour obtenir un éclaircissement progressif de la chevelure. Cette durée est généralement de plusieurs semaines.

Exemple 12 : Crème main (gel-crème anti-taches) pour les mains

Caprilic/capric diglyceryl succinate	6%
Octyl octanoate	2.5%
Methoxycinnamate d'octyle	6%
Oligonucléotide SEQ ID NO. 5 (phosphodiester)	0.001%
Phenyltriméticone	2.5%
Benzophenon-3	0.5%
Hyaluronate de sodium	0.05%
Gomme xanthane	0.2%
Acrylates/C10.30 alkyl acrylate copolymer	0.5%
Glycerine	2%
PEG 150	3%
Neutralisants, Colorants, parfum, conservateurs	qs
Eau purifiée	qsp 100%

Cette crème doit être appliquée directement sur les taches de sénescence (lentigos séniles) des mains, pour en atténuer la coloration.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider avec le gène ou un produit du gène codant pour l'une des enzymes essentielles intervenant dans la voie de synthèse de la mélanine, caractérisé en ce que lesdites enzymes sont choisies parmi la tyrosinase et la tyrosinase-related-protein 1 (TRP-1).
2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est capable de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase.
3. Oligonucléotide selon la revendication 1 ou 2, capable de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN ou l'ARNm codant pour la tyrosinase.
4. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est capable de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou un produit du gène codant pour la TRP-1.
5. Oligonucléotide selon la revendication 1 ou 3, capable de s'hybrider spécifiquement avec l'ADN ou l'ARNm codant pour la TRP-1.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région présentant le codon d'initiation du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase.
7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région codante du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase.
8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région 3' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la tyrosinase.
9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1, 4 ou 5, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région 5' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1.
- 30 10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1, 4 ou 5, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région présentant le codon d'initiation du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1

11. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1, 4 ou 5, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région codante du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1
12. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1, 4 ou 5, capable de s'hybrider de façon spécifique avec la région 3' non codante du gène ou de l'ARNm codant pour la TRP-1
13. Oligonucléotide selon la revendication 6 dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID NO.6 à NO.8 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID NO.6 5'-AGGAACCTGGCTAATTGGAGT-3'
 - SEQ ID NO.7 5'-CAAGGTCTGCAGGAACCTGGC-3'
 - SEQ ID NO.8 5'-CCTCACAAAGGTCTGCAGGAA-3'
14. Oligonucléotide selon la revendication 7 dont la séquence est la séquence SEQ ID NO.10 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID NO.10 5'-GCATTCTTCCTCTAGTCCTC-3'
15. Oligonucléotide selon la revendication 8 dont la séquence est la séquence SEQ ID NO.9 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID NO.9 5'-CTACAGACAATCTGCCAAGA-3'
16. Oligonucléotide selon la revendication 10 dont la séquence est l'une des séquences SEQ ID NO.1 à NO.4 ou SEQ ID NO.11 ayant la signification suivante :
- 20 - SEQ ID NO.1 5'-GCAAAACAAAGACCTGGTTT-3'
 - SEQ ID NO.2 5'-AGACCTGGTTGCAGCTCTT-3'
 - SEQ ID NO.3 5'-TGCTTGAAATAAGAGTGCAA-3'
 - SEQ ID NO.4 5'-AAAATCCAGCTCACAAATCCT-3'
- 25 - SEQ ID NO.11 5'-TTCCAGTACCTCACAAATCCT-3'
17. Oligonucléotide selon la revendication 11 dont la séquence est la séquence SEQ ID NO.5 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID NO.5 5'-AGGAGCACTCATTCTGCTTG-3'
18. Oligonucléotide en tant que produit nouveau dont la séquence est l'une des séquences ID NO.1 à NO.11 ayant la signification suivante :
 - SEQ ID NO.1 5'-GCAAAACAAAGACCTGGTTT-3'
 - SEQ ID NO.2 5'-AGACCTGGTTGCAGCTCTT-3'
 - SEQ ID NO.3 5'-TGCTTGAAATAAGAGTGCAA-3'

- | | | | |
|---|---|--------------|------------------------------|
| | - | SEQ ID NO.4 | 5'-AAAATCCAGCTCACAAATCCT-3' |
| | - | SEQ ID NO.5 | 5'-AGGAGCACTCATTCTGCTTG-3' |
| | - | SEQ ID NO.6 | 5'-AGGAACCTGGCTAATTGGAGT-3' |
| | - | SEQ ID NO.7 | 5'-CAAGGTCTGCAGGAACTGGC-3' |
| 5 | - | SEQ ID NO.8 | 5'-CCTCACAAAGGTCTGCAGGAA-3' |
| | - | SEQ ID NO.9 | 5'-CTACAGACAATCTGCCAAGA-3' |
| | - | SEQ ID NO.10 | 5'-GCATTCTTCCTCTAGTCCTC-3' |
| | - | SEQ ID NO.11 | 5'-TTCCAGTACCTCACAAATCCT-3'. |
19. Oligonucléotide selon l'une des revendications précédentes, comprenant une ou plusieurs modifications chimiques au niveau de ses parties sucres, ses parties nucléobases ou son squelette internucléotidique, lesdites modifications conférant des caractéristiques physico-chimiques souhaitables telles qu'une biodisponibilité accrue, l'augmentation de l'affinité pour les séquences cibles, l'augmentation de l'internalisation cellulaire ou une meilleure stabilité biologique ou l'augmentation de la stabilité en présence de nucléases cellulaires.
20. Oligonucléotide selon la revendication 20, caractérisé en ce que sa partie sucre comprend un substituant 2'-O-fluoro ou 2'-O-alkyle, préférentiellement un substituant 2'-O-éthylloxyméthyle ou 2'-O-méthyle.
- 20 21. Oligonucléotide selon la revendication 20 ou 21, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique est remplacée par des groupements phosphorothioates.
22. Oligonucléotide selon la revendication 20 ou 21, caractérisé en ce qu'une partie des groupements phosphodiesters de son squelette internucléotidique 25 est remplacée par des groupements méthylphosphonates.
23. Oligonucléotide selon la revendication 22, caractérisé en ce que tous les groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements phosphorothioates.
24. Oligonucléotide selon la revendication 23, caractérisé en ce que tous les 30 groupements phosphodiesters sont remplacés par des groupements méthylphosphonates.
25. Oligonucléotide selon les revendications 22 et 23, caractérisé en ce que les groupements phosphodiesters sont remplacés en tout ou partie par des

groupements phosphorothioates et/ou par des groupements méthylphosphonates.

26. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 26 auquel on a greffé un vecteur d'administration linéaire de type acide nucléique ou peptidique, ou un vecteur d'administration circulaire de type plasmidique.
5
27. Oligonucléotide selon l'une des revendications précédentes en tant que médicament.
28. Composition cosmétique ou dermatologique contenant au moins un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 27 et un milieu 10 cosmétiquement ou dermatologiquement acceptable.
29. Composition cosmétique ou dermatologique selon la revendication 29 contenant un ou plusieurs agents actifs choisis parmi l'acide ellagique et ses dérivés ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothenate sulfonate et ses dérivés ; des molécules interférant directement 15 ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou 20 greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acétate, en préparation liposomique ou non ; des agents antiglycations et/ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la 25 pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc micronisés ; et 30 les acides désoxyribonucléiques ou nucléiques.

30. Composition selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que le/les oligonucléotides représentent 0,00001 % à 10 %, de préférence 0,0003 % à 3 % du poids total de la composition.
31. Composition cosmétique ou dermatologique selon l'une des revendications 29 à 31, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme habituellement utilisée pour une application topique et notamment sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion de particules polymériques, telles que des nanosphères et des nanocapsules, dans une phase aqueuse ou huileuse, ou encore d'une dispersion de vésicules lipidiques de type ionique ou non-ionique.
5
32. Utilisation comme agent cosmétique d'un oligonucléotide comportant un nombre de nucléotides compris entre 7 et 25, de préférence égal à 20, capable de s'hybrider avec le gène ou un produit du gène codant pour l'une des enzymes essentielles intervenant dans la voie de synthèse de la mélanine choisies parmi la tyrosinase et la TRP-1.
10
33. Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 33 pour dépigmenter ou blanchir la peau, les poils ou les cheveux humains.
15
34. Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 27 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention des maladies se traduisant par la surexpression de la tyrosinase ou de la TRP-1, par voie topique.
20
35. Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 27 pour la fabrication d'un médicament destiné à inhiber la synthèse de mélanine.
25
36. Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 36 pour le traitement ou la prévention des hyperpigmentations régionales par hyper-activité mélanocytaire telles que les mélasmas idiopathiques, des hyperpigmentations localisées par hyper-activité et prolifération mélanocytaire bénigne telles que
30 les taches pigmentaires de sénescence (lentigo seniles), des hyperpigmentations accidentnelles telles que la photosensibilisation ou l'hyperpigmentation cicatricielle, et pour le traitement de certaines leucodermies telles que le vitiligo.

37. Utilisation d'un oligonucléotide selon la revendication 35 ou 36 pour la fabrication d'un médicament destiné à dépigmenter ou à blanchir la peau.
38. Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 27 pour moduler l'expression de la tyrosinase ou de la TRP-1.
- 5 39. Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une des revendications 35 à 38 pour la fabrication d'un médicament destiné à être administré de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps en association avec un ou plusieurs agents actifs choisis parmi l'acide ellagique et ses dérivés ; l'hydroquinone ; l'arbutine ; le résorcinol et ses dérivés ; la vitamine C et ses dérivés ; le pantothéнат sulfonate et ses dérivés ; l'acide kojique ; les extraits placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec l'alpha-mélanocyte stimulating hormone (α -MSH) ou son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; les polyols tels que la glycérine le glycol ou le propylène glycol ; les vitamines ; les agents kératolytiques ou desquamants tels que l'acide salicylique et ses dérivés ; les alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique, seuls ou greffés ; l'acide ascorbique et ses dérivés ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol et ses dérivés tels que le palmitate, le propionate ou l'acetate, en préparation liposomique ou non ; des agents antiglycations ou antioxydants pris seuls ou en association tels que le tocophérol et ses dérivés, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, la thiamine pyrophosphate, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; les agents anti-inflammatoires tels que le stéaryl glycyrrhétinate ; les agents apaisants et leurs mélanges, les filtres solaires chimiques ou physiques tels que le méthoxycinnamate d'octyle, le butyl-méthoxydibenzoyl-méthane, l'oxyde de titane et l'oxyde de zinc micronisé ; et les acides désoxyribonucléiques ou nucléiques.
- 10
- 15
- 20
- 25

LISTE DE SÉQUENCES

<110> LVMH RECHERCHE

<120> UTILISATION D'OLIGONUCLÉOTIDES MODULANT L'EXPRESSION DE
LA TYROSINASE ET DE LA TYROSINASE-RELATED-PROTEIN-1
COMME AGENTS DÉPIGMENTANTS

<130> D18673

<150> FR 00 01730

<151> 2000-02-11

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.2

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la
séquence nt 111-92 de l'ADN_c du gène codant pour
la protéine apparentée à la tyrosinase humaine
(TRP - Genbank locus HSTYRRP).

<400> 1

gcaaaacaaa gacctggttt

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la
séquence nt 102-83 de l'ADN_c du gène codant pour
la protéine apparentée à la tyrosinase humaine
(TRP - Genbank locus HSTYRRP).

<400> 2

agacctggtt tgcaagcttt

20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la
séquence nt 127-108 de l'ADN_c du gène codant pour
la protéine apparentée à la tyrosinase humaine
(TRP - Genbank locus HSTYRRP).

<400> 3

tgttgaaat aagagtcaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 53-34 de l'ADN_c du gène codant pour la protéine apparentée à la tyrosinase humaine (TRP - Genbank locus HSTYRRP).

<400> 4

aaaatccagc tcacaatcct

20

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 141-122 de l'ADN_c du gène codant pour la protéine apparentée à la tyrosinase humaine (TRP - Genbank locus HSTYRRP).

<400> 5

aggagcac tcatttgcttg

20

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 475-457 de l'ADN_c du gène codant pour la tyrosinase humaine (Genbank locus HUMTYRA).

<400> 6

aggaactggc taattggagt

20

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 485-466 de l'ADN_c du gène codant pour la tyrosinase humaine (Genbank locus HUMTYRA).

<400> 7

caaggtctgc aggaactggc

20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 490-471 de l'ADN_c du gène codant pour la tyrosinase humaine (Genbank locus HUMTYRA).

<400> 8

cctcacaagg tctgcaggaa

20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 1332-1313 de l'ADN_c du gène codant pour la tyrosinase humaine (Genbank locus HUMTYRA).

<400> 9

ctacagacaa tctgccaaga

20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 506-487 de l'ADN_c du gène codant pour la tyrosinase humaine (Genbank locus HUMTYRA).

<400> 10

gcattcttcc tcttagtcctc

20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence nt 5875-5856 de l'ADN codant pour la protéine 1 apparentée à la tyrosinase humaine (TRP1 - Genbank locus AF 001295).

<400> 11

ttcccagtacc tcacaatcct

20

<210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Contrôle antisens de la séquence ID NO.2.

<400> 12

ttctcgacgt ttggtccaga

20

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Combinaison aléatoire de la séquence ID NO.2

<400> 13

acgtttctcg ccttagtgatg

20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
16 août 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/58918 A3

(51) Classification internationale des brevets² :
C12N 15/11, A61K 7/135,
31/712, 31/7125, 7/48 // A61P 17/00

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00398

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet curasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Date de dépôt international : 9 février 2001 (09.02.2001)

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

(25) Langue de dépôt : français

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 14 mars 2002

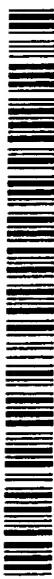
(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LVMH
RECHERCHE [FR/FR]; 20, avenue Hoche, F-75008
Paris (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : KUR-
FURST, Robin [FR/FR]; 553, rue de Couasnon, F-45160
Olivet (FR). JOLY, Régine [FR/FR]; 7, rue Antigna,
F-45000 Orleans (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.: Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).



(54) Title: OLIGONUCLEOTIDES MODULATING THE EXPRESSION OF ENZYMES INVOLVED IN THE SYNTHESIS OF
MELANIC PIGMENTS

A3

(54) Titre : OLIGONUCLEOTIDES MODULANT L'EXPRESSION D'ENZYMES INTERVENANT DANS LA SYNTHESE DE
PIGMENTS MELANIQUES

WO 01/58918

(57) Abstract: The invention concerns novel oligonucleotide sequences and their derivatives. Said novel oligonucleotide sequences are capable of being hybridized with the gene or with a product coding for tyrosinase or with the gene or a product of the gene coding for the tyrosinase-related protein 1 (TRP-1). The invention also concerns the use of said novel oligonucleotide sequences as depigmentation or skin whitening agents in a cosmetic composition or a dermatological composition.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouvelles séquences oligonucléotidiques ainsi que leurs dérivés. Ces nouvelles séquences oligonucléotidiques sont capables de s'hybrider de façon spécifique avec le gène ou avec un produit du gène codant pour la tyrosinase ou avec le gène ou un produit du gène codant pour la tyrosinase related-protein 1 (TRP-1). La présente invention concerne également l'utilisation de ces nouvelles séquences oligonucléotidiques comme agent dépigmentant ou blanchissant dans une composition cosmétique ou dans une composition dermatologique.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT FR 01 00398

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7: C12N 15/11, A61K 7/35, A61K 31/712, A61K 31/725, A61K 7/48, A61P 17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7: C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 714 907 A (HOFFMANN LA ROCHE) 05 June 1996 (05.06.96)	1-3, 19, 20, 27, 33-39
Y	Page 3 –page 4, line 22 Page 30: example 11	4-12, 19-26, 28-39

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 September 2001 (05.09.01)

Date of mailing of the international search report
19 September 2001 (19.09.01)

Name and mailing address of the ISA

Authorized officer

European Patent Office

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 01/00398

C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO, H. ET AL.: "Retroviral infection with human tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) cDNA upregulates tyrosinase activity and melanin synthesis in a TRP-1-deficient melanoma cell line." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY. Vol. 106, no. 4, 1996, pages 744-752. XP000953024 ISSN: 0022-202X The whole document	1, 4, 5, 11 4, 5, 9-12, 38
Y	US 5 078 989 A (ANDO HIDEYA ET AL) 07 January 1992 (07.01.92) The whole document	28-39
Y	WO 95 34280 A (PROCTER & GAMBLE) 21 December 1995 (21.12.95) The whole document	28-39
Y	WO 99 25819 A (UHLMANN EUGEN ;WEISER CAROLINE (DE); HOECHST MARION ROUSSEL DE GMB) 27 May 1999 (27.05.99) Cited in the application Page 4, line 23 –page 5, line 3 Page 6, paragraph 2 –page 13, line 7	6-8, 19-26
X	WO 97 14709 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 April 1997 (24.04.97) Page 7, line 15 – line 28 Page 25, line 11 –page 26, line 24 Page 60; example 9	1-3, 19, 27, 33-39
A	EP 0 895 779 A (L'OREAL) 10 February 1999 (10.02.99) Paragraphs '0017!-'0031!	28,39
A	WO 95 07924 A (SHIH ANDY :BECKMAN JEFFREY MICHAEL (US); DRIVAS GEORGE T (US); RUS) 23 March 1995 (23.03.95) Page 37; example 16 Page 8, last paragraph –page 10 Claims 1-3, 9	1-3, 6-8 19-39
A	BOISSY, R. ET AL.: "Human tyrasinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1." EXP DERMATOL 1998 AUG;7(4):198-204, XP000953013 The whole document	1, 4, 5, 9-12
A	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS. Vol. 90, no. 4, 01 June 1990 (01.06.90), Pages 543-584. XP000141412 ISSN: 0009-2665 Cited in the application The whole document	19-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00398

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although Claims 38 (insofar as the in vivo methods are concerned) and 36 concern a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.
2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See additional sheet.

After review as per PCT Rule 40.2(e), no additional fee is to be refunded.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/00398

The International Searching Authority found several (groups of) inventions in the international application, namely:

1. Claims: 1, 18-39 (partly) and Claims 2-3, 6-8, 13-15

Antisense oligonucleotides (SEQ ID's 6-10) capable of being hybridized with a nucleic acid coding for tyrosinase. Cosmetic or dermatological composition comprising same and their uses.

2. Claims: 1, 18-39 (partly) and Claims 4-5, 9-12, 16-17

Antisense oligonucleotides (SEQ ID's 1 to 5 and 11) capable of being hybridized with a nucleic acid coding for the tyrosinase-related-protein-1(TRP1). Cosmetic or dermatological composition comprising same and their uses.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/00398

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0714907	A 05-06-1996	BR CA CN EP FI JP TR	9505571 A 2163392 A1 1128269 A 0714907 A1 955767 A 8208686 A 960521 A2	04-11-1997 31-05-1996 07-08-1996 05-06-1996 31-05-1996 13-08-1996 21-07-1996
US 5078989	A 07-01-1992		NONE	
WO 9534280	A 21-12-1995	AU AU CA CN CZ EP JP WO	705904 B2 2901995 A 2192665 A1 1152865 A 9603659 A3 0758882 A1 10501817 T 9534280 A1	03-06-1999 05-01-1996 21-12-1995 25-06-1997 15-10-1997 26-02-1997 17-02-1998 21-12-1995
WO 9925819	A 27-05-1999	DE AU WO EP	19750702 A1 1156699 A 9925819 A2 1030914 A2	27-05-1999 07-06-1999 27-05-1999 30-08-2000
WO 9714709	A 24-04-1997	AU WO US	7286696 A 9714709 A1 5780607 A	07-05-1997 24-04-1997 14-07-1998
EP 0895779	A 10-02-1999	FR CN EP JP JP	2765801 A1 1208608 A 0895779 A1 3162342 B2 11071225 A	15-01-1999 24-02-1999 10-02-1999 25-04-2001 16-03-1999
WO 9507924	A 23-03-1995	WO	9507924 A1	23-03-1995

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 01/00398

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
CIB 7 C12N15/11 A61K7/135 A61K31/712 A61K31/7125 A61K7/48 //A61P17/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 714 907 A (HOFFMANN LA ROCHE) 5 juin 1996 (1996-06-05)	1-3, 19, 20, 27, 33-39
Y	page 3 -page 4, ligne 22 page 30; exemple 11 ---	4-12, 19-26, 28-39 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
5 septembre 2001		19.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Andres, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C	nde Internationale No PCT/FR 01/00398
---	--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ZHAO, H. ET AL.: "Retroviral infection with human tyrosinase-related protein-1 (TRP-1) cDNA upregulates tyrosinase activity and melanin synthesis in a TRP-1-deficient melanoma cell line." JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 106, no. 4, 1996, pages 744-752, XP000953024 ISSN: 0022-202X le document en entier ----	1, 4, 5, 11
Y	US 5 078 989 A (ANDO HIDEYA ET AL) 7 janvier 1992 (1992-01-07) le document en entier ----	4, 5, 9-12, 38
Y	WO 95 34280 A (PROCTER & GAMBLE) 21 décembre 1995 (1995-12-21) le document en entier ----	28-39
Y	WO 99 25819 A (UHLMANN EUGEN ;WEISER CAROLINE (DE); HOECHST MARION ROUSSEL DE GMB) 27 mai 1999 (1999-05-27) cité dans la demande page 4, ligne 23 -page 5, ligne 3 page 6, alinéa 2 -page 13, ligne 7 ----	6-8, 19-26
X	WO 97 14709 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 avril 1997 (1997-04-24) page 7, ligne 15 - ligne 28 page 25, ligne 11 -page 26, ligne 24 page 60; exemple 9 ----	1-3, 19, 27, 33-39
A	EP 0 895 779 A (L'OREAL) 10 février 1999 (1999-02-10) alinéas '0017!-'0031! ----	28, 39
A	WO 95 07924 A (SHIH ANDY ;BECKMAN JEFFREY MICHAEL (US); DRIVAS GEORGE T (US); RUS) 23 mars 1995 (1995-03-23) page 37; exemple 16 page 8, dernier alinéa -page 10 revendications 1-3, 9 ----	1-3, 6-8, 19-39
A	BOISSY, R. ET AL.: "Human tyrosinase related protein-1 (TRP-1) does not function as a DHICA oxidase activity in contrast to murine TRP-1." EXP DERMATOL 1998 AUG;7(4):198-204, XP000953013 le document en entier ----	1, 4, 5, 9-12
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

C	Inde Internationale No PCT/FR 01/00398
---	---

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, vol. 90, no. 4, 1 juin 1990 (1990-06-01), pages 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665 cité dans la demande le document en entier -----	19-26
2		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

emande internationale n°
PCT/FR 01/00398

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Bien que les revendications 38 (dans la mesure de procédés *in vivo*) et 36 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. Les revendications n°s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

Après réexamen selon la Règle 40.2(e) PCT,
aucune taxe additionnelle n'est à rembourser.

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. revendications: 1,18-39 (partiellement) et revendications 2-3,6-8, 13-15

Oligonucléotides antisens (SEQ IDs 6 à 10) capables de s'hybrider avec un acide nucléique codant pour la tyrosinase. Composition cosmétique ou dermatologique les comprenant et leurs utilisations.

2. revendications: 1,18-39 (partiellement) et revendications 4-5, 9-12,16-17

Oligonucléotides antisens (SEQ IDs 1 à 5 et 11) capables de s'hybrider avec un acide nucléique codant pour la tyrosinase-related protein-1 (TRP1). Composition cosmétique ou dermatologique les comprenant et leurs utilisations.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Date Internationale No

PCT/FR 01/00398

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0714907	A	05-06-1996	BR CA CN EP FI JP TR	9505571 A 2163392 A1 1128269 A 0714907 A1 955767 A 8208686 A 960521 A2	04-11-1997 31-05-1996 07-08-1996 05-06-1996 31-05-1996 13-08-1996 21-07-1996
US 5078989	A	07-01-1992	AUCUN		
WO 9534280	A	21-12-1995	AU AU CA CN CZ EP JP WO	705904 B2 2901995 A 2192665 A1 1152865 A 9603659 A3 0758882 A1 10501817 T 9534280 A1	03-06-1999 05-01-1996 21-12-1995 25-06-1997 15-10-1997 26-02-1997 17-02-1998 21-12-1995
WO 9925819	A	27-05-1999	DE AU WO EP	19750702 A1 1156699 A 9925819 A2 1030914 A2	27-05-1999 07-06-1999 27-05-1999 30-08-2000
WO 9714709	A	24-04-1997	AU WO US	7286696 A 9714709 A1 5780607 A	07-05-1997 24-04-1997 14-07-1998
EP 0895779	A	10-02-1999	FR CN EP JP JP	2765801 A1 1208608 A 0895779 A1 3162342 B2 11071225 A	15-01-1999 24-02-1999 10-02-1999 25-04-2001 16-03-1999
WO 9507924	A	23-03-1995	WO	9507924 A1	23-03-1995

THIS PAGE BLANK (USPTO)